

255-

甲

第九卷 第二期

中華民國三十六年十月

黃海

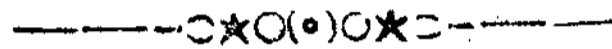
發酵與菌學特輯

黃海化學工業研究社編行
四川五通橋

重慶

黃 海

第九卷 第二期 目錄



DDT應用於保存微菌之試驗.....	蕭永瀾.....	23-28
四川瀘縣大連酒麴的分離與試驗.....	李祖銘.....	28-31
微生物與葡萄酒.....	方心芳.....	32-46
英文摘要.....		47-48

黃 海 雙 月 刊

發 酵 與 菌 學 特 輯

定 價

每 期 三 千 五 百 元

每 年 六 期 二 萬 元

(航空掛號每期各加二千元)

編 行 者 黃 海 化 學 工 業 研 究 社

中 華 民 國 三 十 六 年 十 月

DDT 應用於保存微菌之試驗

黃海化學工業研究社

蕭永瀾

一

微生物的研究，今日普遍於各國。故有許多的試驗室，為着有系統的研究，而保存着很多種的菌。這種保存工作，首先要注意培養基適合於各微菌之營養及不會促變其形態與生理。次要注意培養的菌保持純種。微菌之不死亡當然更不能忽略。

保持微菌純種一問題，比保持微菌之不死亡還難。因為在接種時須要着精確技術，否則空氣中飄浮着的菌類孢子就會侵入。當然了在接種之前可將工作室清理，且閉門窗，勿令空氣流動太大。但是在你正接種時，由接種針取出之孢子亦會飛揚。此外有些絲狀菌自身很易粘附着細菌，都是工作者的擾害。

甚至於精熟的技術工作者，有時亦會被別菌所攙雜。那就是小動物挾帶了。有些小動物嗜食培養基，乃鑽過培養管口之棉栓，而將它自身粘着之孢子或少數細菌帶入培養基中。這種小生物已知者有小蜘蛛類 (Mites)，小甲蟲類 (Beetles)，牠們若果蹲伏於一處不動，那你分不清是一點污塵還是牠。

在我們試驗室中發現有二種，都是放大 90 倍，惜無照像設備，不能影獻於諸君。一種是如一懸滴之頭小肚大者，身長自尾至口 58 μ ，嘴兩旁各有粗短之觸鬚一根，口各尖齒前後伸縮，有足四對，前一對足與後一對足比中間之二對足長，各足之尖端皆有一小圓形盤，該虫色微黃。餘一種頭大身長如一天牛但無翅，嘴兩旁各有細長觸鬚一根，足二對，身長自頭至尾 71.5 μ ，色灰色。二者以前者為多。

解決此問題，已有許多歐美學者工作着，且先後給了我們很多的供獻：如 Jewson and Fattersfield 二氏於 1922 用吡啶 (Pyridine) 薰培養管。Page and Shafik 二氏於 1936 用四氯化碳 (Carbon tetrachloride) 及水楊酸甲酯 (Methyl Salicylate) 作薰殺劑。Pease 氏於 1937 用對一二氯苯 (P-dichlorobenzene) 作薰殺劑。Crowell 氏於 1941 再以對一二氯苯試驗，最近之凍乾保存法 (Freeze-drying) 等，都是極有效的制止法。

DDT 於近幾年來，廣泛的被應用着，而引起了我們這個試驗。為了先知道 DDT 對於各菌之防害，所以先直接將 DDT 注入培養基中，以觀察其對於各菌之影響。

二

先將培養基作好，每試管裝入 5c.c. 於加壓殺菌器，經 15 磅 15 分鐘的殺菌，取出冷至 50°C，將所有管分組，逐管加入不同量之 DDT (用作試驗之 DDT 係生化藥廠出品，內含 5% 之 DDT 汽油溶液)。然後搖勻，放成斜面冷卻之，待冷好再接入各菌。此試驗所用之菌有 Rhizopus 20 號，Mucor 25 號，Aspergillus Oryzae 301, Penicillium notatum 452, Aspergillus Niger 316, Lacticacid Bacteria 510, Yeast 116, Rhodotorula 2648 號，各菌皆係本試驗室保存者。述結果如次：

Rhizopus 20 號

DDT量	生長情形						備註
	13小時	21小時	36小時	43小時	62小時	110小時	
2.5%	—	—	+	+	+	+	僅長菌落約1cm.大
1.8%	—	—	+	+	+	+	同
1.6%	—	+	+	+	+	+	同
1.4%	—	+	+	+	+	+	同
1.2%	—	+	+	+	+	+	長滿培養基斜面之半
1.0%	—	+	+	+	+	+	同
0.6%	—	+	+	+	+	+	菌絲帖伏於培養基面，不生氣菌絲。
0.4%	+	+	+	+	+	+	同
0.2%	+	+	+	+	+	+	同
0.1%	+	+	+	+	+	+	
0	+	+	+	+	+	+	

Mucor 25 號

DDT量	生長情形						備註
	13小時	21小時	36小時	43小時	62小時	110小時	
2.5%	—	—	+	+	+	+	菌落約1cm.大，無氣菌絲
1.8%	—	—	+	+	+	+	同
1.6%	—	+	+	+	+	+	同
1.4%	—	+	+	+	+	+	菌落稍大，仍無氣菌絲。
1.2%	—	+	+	+	+	+	同
1.0%	+	+	+	+	+	+	同
0.6%	+	+	+	+	+	+	菌落約培養基斜面之半，仍無氣菌絲
0.4%	+	+	+	+	+	+	同
0.2%	+	+	+	+	+	+	同
0.1%	+	+	+	+	+	+	同
0	+	+	+	+	+	+	同

Aspergillus O. 301 號

DDT量	生長情形						備註
	13小時	21小時	36小時	43小時	62小時	110小時	
2.5%	—	—	+	+	++	+++	孢子色黃
1.8%	—	—	+	+	++	+++	孢子大半深綠色
1.6%	—	—	+	++	+++	+++	62小時孢子尚黃色
1.4%	—	+	++	+++	+++	+++	同
1.2%	—	+	++	+++	+++	+++	同
1.0%	+	++	+++	+++	+++	+++	孢子深綠色
0.6%	+	++	+++	+++	+++	+++	62小時孢子即變深綠色
0.4%	+	++	+++	+++	+++	+++	同
0.2%	++	++	+++	+++	+++	+++	36小時孢子色黃， 後即變深綠色
0.1%	++	++	+++	+++	+++	+++	同
0	++	+++	+++	+++	+++	+++	孢子黃綠色

Aspergillus N. 316 號

DDT量	生長情形						備註
	13小時	21小時	36小時	43小時	62小時	110小時	
2.5%	—	—	—	+	++	+++	62小時尚未生孢子， 孢子變黑慢
1.8%	—	—	—	+	++	+++	同
1.6%	—	—	+	+	++	+++	同
1.4%	—	—	+	++	+++	+++	孢子變黑慢
1.2%	—	+	++	+++	+++	+++	同
1.0%	+	++	+++	+++	+++	+++	同
0.6%	+	++	+++	+++	+++	+++	同
0.4%	+	++	+++	+++	+++	+++	孢子變黑慢
0.2%	+	++	+++	+++	+++	+++	同
0.1%	+	++	+++	+++	+++	+++	
0	+	+++	+++	+++	+++	+++	

Penicillium Notatum 452

DDT量	生長情形						備註
	13小時	21小時	36小時	48小時	62小時	110小時	
2.5%	—	—	+	+	+	+	菌絲粘於培養基 無菌絲亦無孢子
1.8%	—	—	+	+	+	+	同
1.6%	—	—	+	+	+	+	同
1.5%	—	—	+	+	+	+	同
1.4%	—	—	+	+	+	+	同
1.0%	—	—	+	+	+	+	同
0.6%	—	—	+	+	+	+	同
0.4%	—	—	+	+	+	++	無菌絲，孢子生 長慢亦少。
0.2%	—	—	+	+	+	++	同
0.1%	+	+	+	+	++	++	同
0	+	+	++	++	++	++	

Lacticacid Bacteria 510

DDT量	生長情形						備註
	13小時	21小時	36小時	48小時	62小時	110小時	
2.5%	—	—	—	—	+	+	菌落很小
1.8%	—	—	—	—	+	+	同
1.6%	—	—	—	—	+	+	同
1.4%	—	—	+	+	+	+	同
1.2%	—	—	+	+	+	+	同
1.0%	—	—	+	+	+	++	菌落較大表面不光滑
0.6%	—	—	+	+	++	++	同
0.4%	—	—	+	+	++	++	同
0.2%	—	—	+	+	++	++	同
0.1%	—	—	+	+	++	++	同
0	—	+	++	++	++	++	

Yeast 116

DDT量	生長情形						備註
	13小時	21小時	36小時	43小時	62小時	110小時	
2.5%	—	+	卅	卅	卅	卅	菌落面粗糙不光澤
1.8%	—	+	卅	卅	卅	卅	同
1.6%	—	+	卅	卅	卅	卅	同
1.4%	—	+	卅	卅	卅	卅	同
1.2%	—	+	卅	卅	卅	卅	同
1.0%	—	+	卅	卅	卅	卅	同
0.6%	+	+	卅	卅	卅	卅	同
0.4%	+	+	卅	卅	卅	卅	同
0.2%	+	+	卅	卅	卅	卅	同
0.1%	卅	卅	卅	卅	卅	卅	同
0	卅	卅	卅	卅	卅	卅	

Rhodotorula 2643

DDT量	生長情形						備註
	13小時	21小時	36小時	48小時	62小時	110小時	
2.5%	—	—	+	+	+	+	菌落很小色亦不很紅
1.8%	—	—	+	+	+	+	同
1.6%	—	+	+	+	+	+	同
1.4%	—	+	+	+	+	+	同
1.2%	—	+	+	+	+	+	同
1.0%	—	+	+	+	+	+	同
0.6%	—	+	+	+	+	+	同
0.4%	—	+	+	+	+	+	同
0.2%	—	+	+	+	卅	卅	菌落較大色亦較紅
0.1%	+	+	+	+	卅	卅	同
0	+	+	卅	卅	卅	卅	

註解：「十」表示菌繁殖 「卅」表示繁殖最好

「卅」表示生孢子 「卅」表示孢子生長完全

由這些試驗說明 DDT 濃度達 2.5% 尚不能致菌死亡，固然有些菌生長已顯不良或緩慢。

Rhizopus 與 *Mucor* 之菌絲粘伏於培養基之斜面上，不生氣菌絲。

Penicillium 自 0.2% 以上之 DDT 繁殖即緩，且胞面生成亦不盛。

Aspergillus O. 自 0.2% 以上之 DDT 孢子之色深綠。

Aspergillus N. 自 0.1% 以上之 DDT 孢子變黑緩慢，待達 1.6% 以上濃度，則孢子生成遲至 6) 小時以後。

Yeast 自 0.2% 以上之 DDT 菌落面相糙不光澤，經顯微鏡檢查，細胞并無變形。

Lactic acid bacteria 自 0.1% 之 DDT 生長即緩慢，而未加 DDT 者亦緩，似由於培養基之關係，或由於與空氣接觸面大及溫度不高之故耳。

三

使上面的試驗指示 DDT 對於各菌之影響不大，故即用以噴射微菌之菌藏櫥，俾殺滅鼠害之小動物。經三個月之試驗，知效果甚佳，今逐月述關於下：

第一月噴射 DDT 後，經過一星期，檢查櫥中各菌之情形，被擾害者突增，此或由於小動物受不了 DDT 之氣氛，而急向各培養管中鑽，以求暫避所致。於是將各被害之菌取出，重行培養，再噴射 DDT。待月底檢查，被擾害者即減少。

第二月將第一月之培養管完全取出，重換新培養基，接種後放於櫥中，再噴射 DDT。待月半檢查，僅數管受害，取去，再噴 DDT，至月底檢查已無被害者矣。

第三月將第二月所有之培養管取出，重換新培養基，接種後仍放於櫥中，再噴射 DDT，待月半檢查并無被害者，乃再噴射 DDT，至月底仍無被害者，經詳查各菌之生殖，生孢子等并無變異，*Yeast* 之菌落亦無粗糙不光澤之現象。故以後即每重換新培養基，噴射 DDT 一次。

誌謝：此試驗於方必芳先生指導下完成，特此謝忱。

民國三十六年七月

四川瀘縣大麴酒酒麴的分離與試驗

李祖銘

瀘縣大麴酒早著名於全川，人多喜好，實為佳釀。余去年曾專函天成生麴酒廠郭龍先生，索取此麥麴，即從事分離與發酵力的比較試驗，且承蒙馬壽徵與吳香魁兩先生嗣後指導下完成此工作，特誌謝忱，茲將其實驗結果述之如下。

一、菌類的分離

此分種法，採用扁平分離。其法；先將酒麴放在已消毒研鉢內磨細，取此磨細麴粉少許，放入盛有無菌水的試管內搖勻，再以麥芽汁洋菜固體培養基三管，編為 1,2,3 號，置於沸水中，使融化，保溫於熱水中，「其目的使之不會凝固」然後即將上備有麴粉的無菌水試管，用消毒後的白金針接入已融化培養基第一號試管中，搖勻，再用消毒白金針由第一號試管培養基中接入第二號試管培養基內，仍如前搖勻，此時即取已消毒培養皿 (Petri's dish) 三套，仍然照前試管編為 1,2,3 號，將第一號試管培養基傾入第一號培養皿內，蓋好搖勻，第二號試管菌體仍如第一號試管接入第三號試管培養基中，并如第一號試管培養基傾入第二號培養皿內，蓋好搖勻。最後將第三號試管培養基傾入第三號培養皿內，蓋好搖勻。此時即將培養皿等置於恆溫箱中，保溫於 5 度—35 度，經二三日後即見培養皿內各菌體的生長狀態，後將各菌體分接於試管固體培養基中，單獨培養，供後試驗。

二. 形態觀察

取分得的菌體，于顯微鏡下觀察，共有三大類：

(1) 固體培養基上生長旺盛，此類有兩種，一為先白而後黃 (A₁)，一為先白而後黑 (A₂)。兩者菌絲均分節，且異常分明，其頂端膨大呈一球囊，囊外生許多酒瓶樣的小枝，每一小枝上一串圓狀孢子，此性狀似 *Aspergillus* 屬的一般性質，故此菌可實此屬的兩種。

(2) 固體培養基上生長亦旺，菌叢灰白色，菌絲無格膜，每菌絲頂端膨大為一圓球囊，此性狀列入 *Rhizopus* 屬內。

(3) 另一類菌體為單細胞，以出芽繁殖，于固體培養基上，菌落光滑，如凝固脂肪，此為酵母 (Yeasts) 類，共有兩種 (即 Y₁, Y₂)。

三. 生理試驗

(甲) 酵母 (Yeasts)

(1) 在體生長形態與細胞形狀大小

將各菌體分別培養洋菜麥芽汁固體斜面培養基上，顯微鏡下，觀察其生長狀況，與細胞形態，并用測微計 (Micrometer)，測其細胞的大小，如第一表。

菌 號	發育狀態	細胞形狀	細胞大小
Y ₁	菌落中央凹下，放射線很多面 光澤蛋白色。	卵 圓 形	3 - 4 μ
Y ₂	菌落中央稍隆起，邊緣平滑， 為乳白色。	球 形	3 - 7 μ

(2) 生長溫度的試驗

以麥芽汁洋菜固體培養基，接種各菌體置於各不相同的溫度中，觀察其生長狀態，結果如第二表。

生長狀態 菌種	溫度	1°-5°c	10°-15°c	20°-25°c	25°-30°c	32°-35°c
y ₁		(一)	(一)	(十)	(卅)	(卅)
y ₂		(一)	(十)	(卅)	(卅)	(一十)

註明：(一)表示不發育(十)表示稍發育(卅)表示生長佳良(卅)表示生成旺盛(一十)表示發育停止。

(3) 糖類發酵力的比較試驗

(子) 糖溶液中發酵力的比較

用三角瓶(250c.c.)八個，每瓶裝糖液(配合法：飴糖18克，乳酸(20%)6c.c.，尿5c.c.，加水至100c.c.)行間歇殺菌三次後，分別接種不同菌種，將此三角瓶置於25°c-30°c恆溫箱中，使之發酵，經過三四天後，以肉眼觀察，每瓶都生有渣滓，其結果如第三表。

瓶號	菌別	發酵後減輕重量 (g)	發酵後的濃度 (Be°)
1	y ₁	5.92	5.00
2	y ₁	5.92	4.95
3	y ₂	6.80	4.25
4	y ₂	6.82	4.25
5	F.396	8.00	2.00
6	F.396	8.00	2.10
7	黃海116	7.20	2.40
8	黃海116	7.25	2.38

由上表可知，此次分得的酵母菌，以y₂發酵力較強，但次于黃海116與F.396。

(丑) 蔗糖液中發酵力的比較

用八個三角瓶(250c.c.)每瓶裝蔗糖液(蔗糖八份，硫酸銨溶液(8%)一份，水一百份)100c.c.，其溶液濃度Be7.5°。行間歇殺菌三次後，分別接入不同的菌種，將此三角瓶置於25°c-30°c恆溫箱中，使其發酵，每距二十四小時後，稱其重量，約

經三四天左右，以減輕的重量比較其發酵力，如第四表。

瓶 號	菌 別	發酵後減輕重量 (g)	發酵後的糖濃度 (Be°)
1	y ₁	5.72	5.10
2	y ₁	5.68	5.68
3	y ₂	6.95	4.5
4	y ₂	7.10	4.5
5	F.896	7.45	2.8
6	F.896	7.45	2.8
7	黃海116	8.00	2.6
8	黃海116	8.01	2.7

由上表可知分得的菌種，以 y₂ 發酵力較強。

(C) *Aspergillus* 屬。

(1) *Aspergillus* 屬各菌種，經洋菜麥芽汁固斜面培養基上生長狀態，及其分生芽胞的大小，如第五表。

菌 號	發育狀態	分生芽胞的大小
Δ1	菌叢黃綠，頂囊球狀，分生芽胞小球形顆粒性。	5-7 μ
Δ2	菌叢黑褐，頂囊球狀，分生芽胞形粒性面。	4-6 μ

(2) 糖化力的比較試驗

(I) 用三角瓶 (500 c.c.) 三個，每瓶裝已蒸熟的米飯 50g。行間歇殺菌三次，每次一小時半左右，然後分接不同的菌種，置于恆溫箱中，經 30°-35°c 溫度下，培養一晝夜，菌絲繁殖旺，此時于每瓶中加入沸水 150 c.c.，置于 50°c-60°c 溫水鍋中經過 5-6 小時，即達糖化目的，以舌嚐其味，結果以 Δ1 最甜，Δ. *Oryzae* 次甜，Δ2 更次之，由此可知，分得菌種中以 Δ1 糖化力較強。

(II) 以澱粉水解作用測糖化力。

取 Czapek 氏培養液，其 PH 為 7，加 1% 可溶性澱粉，分注試管內，每管盛 10c.c.，行間歇殺菌三次，後接種一定分量不同的菌體，在 30°c-35°c 恆溫箱中，發酵 18-20 日後，以碘液試測其澱粉量，結果以 Δ1 的藍色反應最少，Δ. *Oryzae* 的藍色反應較多，即可證明此次分得菌種中，以 Δ1 糖化力較強。

三十六年二月于四川教育學院微生物研究室

微生物與葡萄酒

方心芳

第一節 葡萄酒中之微生物及其作用

關於各發酵工業內，所遇到的微生物，益菌與害菌，我們早想加以簡要的介紹，且說明其管制之道，備作同好之參考。近見葡萄酒釀造微生物文獻數篇，皆名家之作，遂加以翻譯，集為是篇。首先說明一般的微菌，再述純種釀酒法及二氧化硫之作用，最後殿以酸之關係。因為所釀葡萄酒者，為酵母使葡萄汁變成酒，但細菌等易致酒壞，須用 SO_2 及純種法滅滅之，葡萄酒之澄清，醇之力也。

(一) 酵 母

葡萄酒與葡萄汁的重要區別，在葡萄汁內的糖類，變成乙醇， CO_2 ，及些乙醇發酵的微量副產品，如醋酸，乙醛，數種酯類、甘油，乳酸及琥珀酸。在巴斯德研究葡萄酒微菌及其報告公佈之前(Études sur le vin 1873)，酒精發酵的遺理，大家都在猜想附會著。或說發酵非生物之造，或說發酵液中常見的酵母乃無父母的生物，自然發生者。巴氏證明酒精發酵是酵母幹的生物作用，這些酵母，非自無生命物質中生出，葡萄汁中必須有生活着的酵母細胞存在，才能由彼等引起發酵作用。所以釀造葡萄酒之主要發動者，是酵母。

(1) 葡萄汁及酒中微菌活動之先後。

若是不加外力，協助某一類微菌壓倒他類微菌的話，則各類微菌活動的情況如後：自葡萄壓破後 24 小時，室溫，所謂野酵母，尤其是檸檬形酵母迅速的繁殖，且引起一種微弱的發酵現象。其他的弱發酵性酵母，如畢氏酵母菌(Picilia)，及 Candida 菌有時也參加活動。于 48 小時內，這些野酵母，常被真正的葡萄酒酵母菌(Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus 或簡稱 S. ellipsoideus) 所代替。嗣後三至四星期，總是葡萄酒酵母菌統制一切，且于合適環境下，將原來含 15—23% 的糖類，減少至 0.2%，同時生出相當的乙醇及 CO_2 。

有時在酵母發酵中，會有乳桿菌類出現(Lactobacillus)，常見者為甘露醇乳桿菌(L. manitovaeus)，L. gracilis 或 L. hilgardii。這些乳桿菌或其他的同類者也能于酒精發酵後，立即繁殖活動。這發酵液與空氣接觸，則醋菌類(Acetobacter) 迅速繁殖，繼承大統，且變乙醇為醋酸及水，屬葡萄酒即轉化為葡萄酒酸矣。若繼續停留于空氣中，則醋菌即分解醋酸為水及二氧化碳，微菌及腐敗細菌開始活動，將所有殘留之有機物，化為無機氮化合物， CO_2 及水，以完成氮碳循環圈。

葡萄酒學者及釀造家之責任，為管制合適的環境，俾真正葡萄酒酵母得以單獨作用，且使其他一切「一種菌例外」的菌類之生長活動，加以限制。此可能例外的一種菌，乃有分解蘋果酸(Malic acid) 能力之細球菌屬(Micrococcus) 之一員。因為某些地方。

葡萄汁酸度非常高，如瑞士及德國之新葡萄酒，須于窖中經發食細球菌 (*M. acidovorax*) 將過多的蘋果酸毀滅，才能食用。故窖藏時，酒人之主要工作在使此類微菌之活動。

(2) 葡萄球上之酵母。

巴斯德早指出葡萄皮上有許多酵母及害菌。王特 (Ventre, 1931, *Traité de vinification*) 說，發芽初起檸檬形酵母及巴氏型酵母活動最力，隨之則為葡萄酒酵母菌。且此三種菌易于顯微鏡下區別之。母拉克等 (Mrak 等 1940) 則說只用顯微鏡不能區別酵母，必須觀察培養情況，孢子形成，及各種碳源之發芽才能保證分類之不錯。兩氏都對。因為巴氏型酵母為臘腸形，葡萄酒酵母為卵形，與檸檬形的酵母混在一塊，當然是易于區別的，且在釀造廠中能區別此三種酵母加以管制，就夠了。不過在酵母學上說，欲鑑定一種酵母，必須用母氏所說手術才行。母拉克氏并且說歐人慣用定義不清之老名詞，如葡萄酒酵母菌，巴氏型酵母，檸檬型酵母，圓形酵母，檸檬酵母型酵母等，信然。然此所以新舊大陸之分乎？以歐人近用 *Escherichia Coli* 一詞觀之，舍舊趨新，自然之理也。

美國方面，Bisletti 氏說葡萄酒酵母菌為葡萄皮上最常見之真正酵母，檸檬型酵母則為常見之假酵母。1912 年氏等研究加利佛尼亞省之葡萄及其酒中之菌，分離出葡萄酒酵母菌，檸檬型酵母及數種雜菌。後來克魯斯 (Cruess) 氏，1918，又自葡萄及正發芽之酒中，分出菌類，鑑定為葡萄酒酵母菌，巴氏酵母菌，異狀魏氏菌 (*Willia anomalus*)，檸檬形酵母菌 (*S. apiculatus*)，擬鱗菌 (*Mycoderma*)，及圓形酵母菌 (*Torula*)。并且證明葡萄在生長中，每個時期，其上之菌類有其特徵。他將葡萄球用無菌的器具壓碎，在葡萄汁瓊脂上培養，計算各菌之數目與比例。

青硬的葡萄球上，微菌最多，每撮葡萄汁內有微菌孢子 100 至 1,000,000 個，野酵母細胞少于 10 個且無葡萄酒酵母菌之存在 (因為 100 撮葡萄汁不能發酵，且為平培養亦未之見)。自葡萄球開始着色，但尚未成熟時，微菌仍操統制權，其數量不減，但野酵母增加為 175,000 個 (每撮)。成熟的葡萄，每撮汁中微孢子 190 至 22,000 個，野酵母約 3000 至 26,000 個，葡萄酒酵母菌則少于一個。另外九個樣品分離鑑定的結果是：每撮葡萄汁內有微孢子 1500 至 9,200,000 個，檸檬型酵母 2,000 至 7,341,000 個，別野酵母 200 至 8,440,000 個，葡萄酒酵母菌少于 1 至 500,000 個。少數微菌存在于數個樣品中。

這許多檢察，都證明要釀酒的葡萄上帶着多量的微菌孢子及野酵母，至於真正的葡萄酒酵母菌則相當少。所以添加純種酵母菌及管制或除去野酵母及微菌是必要的。釀葡萄酒時用硫黃以制害菌的方法，很早就已在歐洲實行着。克氏 (1912) 試驗，加百萬份之 100 至 200 份的 SO_2 於壓碎葡萄或其汁中，實際上即限制微，野酵母及細菌之生長，但是葡萄酒酵母菌之生長繁殖，則不受影響。 SO_2 之利用，實際上世界各處之釀葡萄酒者，都在施行。

母氏等 (1840, *Jour. Bact.* 40, 395) 要算美國研究有關葡萄酒釀造上酵母類之權威者，在加州研究許多年，比克魯斯氏等進步多矣。他依照 Leifc 氏方法工作，應用近代的名命法，所以他的文章甚堪重視。他由各地葡萄上分離出 241 種微菌，鑑定為酵母菌 (*Saccharomyces* 大部分為 *S. cerevisiae*) 者 118 種，接合酵母菌 13 種，漢氏酵母

母菌 (Hansen'spora) 11 種，克氏孢子菌 (Kloeckeriaspora) 1 種，畢氏菌 6 種，斐孢子酵母菌 (Debaryomyces) 3，魏氏菌 (Willia-Hansenula) 4，畢氏接合菌 (Zygoichia) 2，孢子圓形酵母菌 (Torulospira) 1，圓形酵母菌 (Torulopsis) 25，鏈絲菌 6，克氏菌 16，紅帽酵母菌 (Rhodotorula) 6，裂殖胚芽菌 (Schizoblastosporion) 1，Candida 26 種。母氏之結果與歐洲之研究者，如 De Rossi (Z. Bakt. II Abt 98, 469, 1908), Caselli (1935), Verona (1936) 等者一致。母氏鑑定之新種為：Torulopsis Californicus, T. Fermentans 及 Asporomyces uvae。可惜他未指明各種屬在葡萄酒上的細胞數目。依母氏之研究，各菌的分佈不因地域而有別。可是 Holm 氏證明初植葡萄酒的處女地，如加省之 Tulare County，葡萄酒上無真正葡萄酒酵母菌。

(3) 純種酵母菌之利用。

大部分的葡萄酒學者，如王特 (1935), Bioletti (1911), 克魯斯 (1912), Facottet (Vinification, 1926, 巴黎), Theron (1935 南非), 貌來柝同等 (Muller-Hurgau 及 Osterwader (1912, Z. bakt. II, 36, 9), 亞美林 (Amerine 1940) 等等，都主用特選的酵母菌，純種培養加入葡萄酒中發酵，俾得到品質高尚且一律的美酒。不過在葡萄酒工廠中，用純種酵母作引子，沒有用 SO_2 等管製害菌之那末重要，因葡萄酒中有足夠的葡萄酒酵母菌，且只用 SO_2 已能使酒不壞了。

可是酵母中有生特別香味的，可利用此點，以釀出高價的葡萄酒。克氏曾由 200 種加省產葡萄酒酵母菌中，採悉有五六種發生特別的酒香。歐洲的酵母菌也有同樣特性者。

關於利用純種酵母發酵問題，後有專章論述，不再多言。

(4) 二氧化硫之作用。

關於 SO_2 ，以後亦有詳論，於此只談綱領耳。在發酵前，果汁中有百萬份之 100 至 200 份的 SO_2 ，即可得到揮發酸很少，發酵完全，殘留糖類甚少且無害菌葡萄酒。不加 SO_2 時所釀之酒，多為含豐富的揮發酸，害菌繁殖，殘糖衆多。因之甚不健全，易致變壞。有不少因 L. hugaria 毒乳桿菌之作用，以至酸敗不能出售。

Perrot (1931) 及 Osterwader (1934) 都指明葡萄酒時母菌能抵抗相當濃度的 SO_2 。

(5) 溫度之影響。

如同其他的生物一樣，葡萄酒酵母菌之生長發酵，也有其最低，最適及最高溫度。關於此一問題，自 Hansen 氏指出以來，研究者甚多，不勝枚舉。葡萄酒學者都同意，在低溫 (35 至 40 度) 發酵的酒缺乏香味，沒有在 15 至 25 度之合適溫度釀成者優良。

在 35 度以上時，發酵常易陷於中斷，雖有不少糖類存留，但發酵不再進行。在 10 度以下發酵，進行甚慢，且亦可能中止。高溫發酵未完全之酒，頗不健全，貯藏時細菌易於繁殖致壞。

關於發酵時產生多量的熱，及在釀造廠中溫度上升之計算，吾人曾寫發酵熱一文，登於本刊一卷三四期，於此不再詳論。一般說，大桶發酵，溫度易升至 35 至 40 度，使發酵中斷，所以葡萄酒廠應設冷卻裝置，節制溫度於 30 度以下。

溫度與酒精產量之關係，克魯斯 (1936) 氏等曾加試驗。用葡萄酒時母菌之香蜜型者發酵，7 度時生酒 16.45% (容量)，10 度時 16.4%，16 度時 16.65%，20—22 度時

16.5%，25度時13.9%，28度時13.3%，31度時12.2%，34度時8.6%及37度時6.35%。魏氏等曾得到類似的結果。

Osterwalder 氏等曾訓練酵母，能在近零度時發酵，儲瑞士酒窖之用云。

(6) 醋酸之影響

醋酸之濃度雖相當淡對酵母也有毒性。克魯斯氏 (1924) 曾探悉 100 撮培養液中有 0.30 克的醋酸，即使酵母之生長與活動大為遲緩，濃度達到 1% 時，則葡萄酒酵母即完全停止生長。但是酸菜及酸菜湯中含 1% 的醋酸，仍有些酵母繁殖其中。克氏 (1931) 并悉醋酸對葡萄酒之毒性，與 pH 值成反比。即酸度值愈低毒性愈大，最低且毒性最大者為醋酸，很顯然的指出毒性由于非離解之酸所生成。Porchet 氏 (1935) 對醋酸與發酵之影響也有同一結論。

(7) 酵母形成酒精之能力

用葡萄酒酵母依常法發酵含糖多的葡萄汁，所形成最高量的酒精，常為容量 16%。克氏 (1913, 1939) 試驗數種葡萄酒酵母菌「加省產」所生酒精量最高為容量 15.6%。但是他們由西班牙白葡萄酒 (Sherry) 及法國阿巴城葡萄酒之醱酵上分離出 12 種酵母菌及菌形菌。用此類酵母發酵 30 度 Brix 的葡萄汁，所產酒精量容量之 15.6 至 18%。Sannino (1925) 所得之最高產量為 16.0 至 16.5%。克魯斯研究家用葡萄酒酵母菌之巴崗地及香實型菌發酵，很少能達 16%。可是用加糖漿發酵法，則能得到 18%。甚至以上的酒精。

(8) 加糖漿發酵

加濃或所謂 Dessert 葡萄酒是添加好白蘭地於普通葡萄酒中，使其酒精含量達 20—21%。這樣更納一次所用白蘭地之稅，且使葡萄酒之香味為之沖淡。1916 年克魯斯氏等報告一新方法，釀造含酒精多的葡萄酒。其法為將一部分葡萄汁熬濃至 70 度 Brix 的糖漿，于發酵將完時，分數次加入此種糖漿，俾繼續發酵，酒精增高。所用酵母為巴崗地型，所得之酒，含酒精 18—20%。嗣後 (1936) 又加實驗，方法近似，葡萄酒含酒精量 17.06—18.05%。

葡萄汁濃縮液較蔗糖及葡萄糖為佳，因其中含有促進發酵因子。但非維生素 C 及硫胺素之作用。

最近 (1939) 克魯斯氏用西班牙白葡萄酒及法國阿巴酒酵母，再作加糖漿發酵試驗，結果得到含酒精 17.6—19.0% 的葡萄酒。克氏并作過半工業的試驗，用 4000 加侖葡萄汁，所得之酒，含酒精 18%。

總之，此法可工業化也無疑，因所釀造之酒，香氣遠大於加白蘭地之老法所成者也。

(9) 西班牙白葡萄酒及法國阿巴葡萄酒上之醱酵母。

巴斯魯曾研究阿巴 (Arbois) 城之葡萄酒上的醱酵，是形成該黃色葡萄酒的因子。巴氏叫醱菌為酒醱菌 (Mycoderma vini)。

在西班牙的 Jerez 城出的名酒，白葡萄酒或譯舍利酒 (Sherries)，陳放時有同樣的生醱現象發生，大家也都說是葡萄酒醱菌所致。西班牙人稱該醱白花，產醱現象，法西人士皆曰發花。

發花的酒，乙醚及脂類增多，香氣強烈，後味微苦是其特徵。

可是不少時候，醋菌佔了上風，將整桶的葡萄酒變成食醋。

關於這些釀酵母，Prost-Dossier (1933) 氏等發現了新的事實。他們曉得其中有數種酵母。有些菌能形成孢子且能產生高濃度的酒精。因此這些菌非樞酵母（樞酵母不會發芽及生孢子。）Schanderl (1906) 氏也研究 Jerez 釀酵母，知道有時為單一種酵母所組成，也就是發芽葡萄酒中糖類的菌，他們能生孢子，實與真正葡萄酒酵母菌接近也。

上面曾指出克魯斯氏等曾研究法國阿巴及西班牙日來城釀酵母，底菌發芽者 12 種，不會發芽之菌 3 種。發芽力強大之 12 種酵母 很容易在葡萄酒上生長。他們抵抗酒精濃度的能力，因種而異。克氏之菌，有能于含 17% 酒精之葡萄酒上生長者。抵抗高濃度酒精之性質，非常有價值，因為醋菌少有在含酒精 15% 以上之酒中生長者。

這些易產釀酵母與所謂香寶型酵母作比較試驗，前者生成酒精為容量之 16.0-17.7%，而後者只 15.6% 耳。鑑定這些釀酵母的結果，概可分為二類。其一能生孢子者，為 *Sacch. cerev. var. ellipsoideus*。另一類，發芽力強，但無孢子，則為 *Torulopsis*。

美國加省現正用日來及阿巴釀酵母仿製西班牙型之葡萄酒。在釀中曾發現三種畢氏菌及一種魏氏菌，但無甚重要性，因其只能在 18% 或以下之酒精濃度內生長也。

日來及 Chalon 酵母，于釀生活時，氧化乙醇為乙醛或甚至 CO_2 及水，並且能氧化醋酸及不揮發酸。巴斯德曾指出阿巴葡萄酒之釀酵母分解酒中之醋酸。克魯斯 (1937) 也加證明。

日來及阿巴酵母形成一個很特別的派羣。美國加省找不到是類酵母，德國及南非望之葡萄酒內，可以找到類似種類。

(二) 葡萄酒之病

葡萄酒如其他有機物溶液，易為各種微生物所致病。但是在巴斯德發表其傑著前 (1873)，一般均不承認微菌為腐敗之因。如同 Chaptal 氏在其葡萄之種植及葡萄酒之釀造一書 (1801) 內所述理論，為當時酒人相傳之真理。他們相信葡萄酒發酸是葡萄汁中糖及蛋白性物質互相作用的結果。若是糖與蛋白質的量恰當，則得優良美酒，若蛋白質過多於糖，則酒即壞。嗣後幾十年稍有進步，知道發酸是由生物酵母所引起。然大家仍信微菌由蛋白質所變成。這也難怪，因當時的學者，都是化學家，依化學分析結果所下的定義，自然會如此判斷。像我們中國的學者，化學不懂，顯微鏡更無，他們說發酸為陰陽相感的结果，亦宜也。

可見巴斯德因發達於顯微鏡下的微生物，他就將一切的酒壞，歸罪于微菌，也過於偏激。酒中鐵、銅、錫等過多，都會發渾。氧化過筋，也能變味，豈微菌之祟乎？雖然如此，酒病多源微菌，乃為事實。好氧釀酵母及兼性酵母，以及微類，都能使酒致病。需氧的細菌如醋菌，兼性的細菌如某些乳酸菌及球菌，都是葡萄酒發酸的誘起者。

(1) 釀酵母之作祟

法國 Arbois 一帶地方所釀葡萄酒之陳放，止裝半桶。故桶中空氣多，常生一種灰酸酒花。巴斯德對其家鄉所產之酒，曾加深刻之研究。他見釀由母形細胞組成，即名之曰酒釀菌。Arbois 及 Chalon 二地葡萄酒之特別香味，即此菌所給與。但有時他能

將酒中不揮發酸及酒精之一部分解，且形成臭氣惡味。

巴氏將所有葡萄酒上之酵母，稱為酒醱菌。醱菌 (Mycoderma) 一名以後轉變為專指不會繁殖且不生孢子之老酵母了。不少人證明 Arbois, Chalon 及 Jerez 之醱菌，有強耐糖類之力，且大量形成孢子，故非醱菌也明矣。

克魯斯等曾由日來等地葡萄酒之醱內，分出四種酵母，三為畢氏菌，一為魏氏菌。都生孢子，且生少量酒精。其抵抗酒精之能力不大。于 11.2% 酒精之酒中，形成醱，有一種之最高抗酒力為 13.7%。這些酵母常發現于白蘭地廠中。待蒸溜之酒脚等上易見之。氧化乙醇為 CO_2 ，消除酒之香素。故為不受歡迎的菌類。

巴斯德所說的醱酵母，者能抵抗 18—22% 的酒精。所以加濃葡萄酒，即是盛于開口桶中，也不生醱。美國加省之葡萄酒濃度高，皆不沖淡至 13% 以下，也有同一現象。不過醱菌有時則繁殖了。歌用的葡萄酒，不少只含酒精 10.5% 或甚至再少者，桶中若不裝滿封固，醱菌之繁殖，易事也。

醱酵母常提足先從，較醋菌生長的快。可是他的淺灰白色醱以後常被醋菌的半透明，強韌及光滑的醱所代替，不生孢的醱菌也能頂而代之。在醱菌醱的時期，葡萄酒的酸度逐漸少，而醋菌時代，則因醱化作用，酸度漸增。

醱酵母及醋菌都是需氧生物，若將酒桶及瓶口封緊裝滿，他們就無從繁殖致病了。

(2) 酵母菌所引起之渾濁與沈澱

很早以前，歐美酒人都知道甜味叟德那及叟德那 (Sauterne) 葡萄酒易再發醱，其中繁殖之葡萄酒酵母菌使酒渾濁或生成沈澱。所以此類葡萄酒必須添加 SO_2 (百萬分之 300—400) 防止酵母菌生長，或加熱殺菌，或濾除微菌，以杜復生。

Baker (1936) 對此問題，增加研究。加省叟德那酒約含酒精 13%，殘留糖 2 至 8%，有再發醱者。由此再發醱酒中所分離出之酵母，多是葡萄酒酵母菌。有些能抵抗百萬份之 400 份之 SO_2 。這證明法之 SO_2 最高量百萬分之 300 份時常不能預防再發醱之原因。實際上也能證明此理。加省習慣上，于裝瓶時，酒中 SO_2 須為百萬份之 350—400 份 (每升含 350—400 mg)。

別的酒也能生同樣毛病。乾葡萄酒如 Chablis 或 Riesling 型者，只含糖 0.15% 以下，克魯斯 (1928) 氏等發現有時也會渾濁沈澱。就是加濃甜葡萄酒，如 Muscatel, Port, angelica 等，含酒精 2% 或以上，有時酵母也使之渾濁沈澱。

(3) 醋菌之致病

葡萄酒由醋菌醱化成醋的現象，很普通，人類很早就知道。西文醋字 Vin aigre 之創造，為酸酒二字之綜合，可以知之。

酒變醋的原因，還是巴斯德最先指明的。不是酒中雜質使然，是醱菌的生理作用。但是此菌也有祖先，不是由無生物質變成。醱菌 (Mycoderma aceti) 常與酒醱菌 (Mycoderma vini) 同時生存。後者較快，可是結局是酒變醋，醋菌佔了優勝。醋菌為需氧菌，酒桶不裝滿，易於繁殖。反之，目的在醱的話，應裝半桶酒，待其成醋，取出一部分，仍裝同量之酒。留於桶中之醋作為引子，酸性大，醋菌多，酒醱菌不易生長，可謂一種優良醱酒方法。

酒變醋需要大量的氧氣，一分子乙醇加一分子氧氣可生成一分子醋酸，吾們若將氧氣供應，則醋菌自能生長矣。所以將酒瓶及桶裝滿，口塞緊，為酒窖中工作之天字第一號事。任何酒人都不會忽略的！可是在最講究的酒窖中，酒桶有時會裂口，酒洩後，生出空頂，或塞子漏氣，讓空氣進入。所以酒中酒精不太高，含 SO_2 不充足時，醋化作用常免不掉。克魯斯氏等 (1912, 1937, 1938) 試驗葡萄汁及酒中，醋菌對 SO_2 感應都很靈敏，少量存在，菌即不長。

醋菌對酒精之忍耐量，頗不一致。克氏 (1938) 試甘葡萄酒中醋菌在研究室內，含酒精 14.5—15% 之葡萄酒中即不生長，可是在工廠中，含 14.9% 之酒尚能醋化。Vaughn (1942) 說醋菌生長時之酒精極限為 14 至 15% 之間。Bioletti (1912) 以為醋菌忍耐酒精量為 14%。

若是發醇時， SO_2 太少或沒有，紅葡萄酒之皮梗浮渣內，醋菌常大量繁殖，以致揮發酸量大增。

1933 至 1936 年美國加省 (San Joaquin Valley) Muscat 葡萄酒在發醇時，被醋菌所毀壞者甚多。Vaughn (1938) 證明當葡萄酒酵母正活動發醇時，醋菌能繁殖且行醋化作用。克魯斯氏 (1924) 增加多量菌于含有酵母菌引子之葡萄酒中，看其生存競爭狀況。結果看出，有時醋菌勝利，制止乙醇發醇之進行。在先 (1912) 克氏也得到類似的結果，醋菌能產生大量醋酸，以停止酵母之活動，中止乙醇發醇現象。

Vaughn 氏 (1938) 找到，不是所有的醋桿菌 (Acetobacter) 能于酵母共存時迅速行醋化作用。但是自上面所說 Muscat 酒醱中分離出之種類，都具此特性。醋化之行溫度 37 度時較 31 度時為快。在 San Joaquin V. 之葡萄酒附近，葡萄壓碎堆中，甚易達 37 度之高溫。將分出之醋菌，接種於殺菌過之葡萄酒中，則產生一種 Moussey 氣味。從前多將此氣味與乳桿菌連在一起，今知誤矣。

防止醋菌在乙醇發醇時之繁殖，最易施行者，為加百分之 100 份之 SO_2 ，或等價量之重亞硫酸鹽，於未發醇之葡萄酒中。

Vaughn (Wallerstein Laboratory Communications, (11), 5, April, 1942) 之報告，對工業上頗有補益。醋菌之性質及其應用，都加試驗。醋菌之分類亦加討論，彼主張用 Acetobacter，而同意 Kluyver 氏，歸於 Pseudomonadaceae 科內。Acetobacter aceti 為屬典型菌。屬中舊名過多，須加簡化，表同種異名者必不少也。

醋菌酒中有些醋菌於醋化時生一厚膜，有些無膜，即無所謂醋母，可是也能行成很快的醋化作用。醋桿菌直接發酵葡萄糖成醋酸之量甚少，各醋菌無特別之地方性，某一種菌能在啤酒，葡萄酒，蘋果酒，梨酒等等中發現。彼以菌醱之性質，纖維素反應，適溫，氣化特性，色素之形成，羧之創造及用後變作氮素源之能力等特徵，區別了七種醋菌 (A. aceti, A. xylinum, A. rancens, A. melanogenum, A. roseum, A. suboxydans 及 A. oxgdans)，都是強力需要氧氣者。

酸葡萄酒之酸氣味，也可說是酸病 (Acescence)，也很有研究的價值。一般都說是醋酸的原因，Peynaud 氏 (1936) 則證明為醋酸乙脂之故。他試將醋酸加入健全之葡萄酒中，每升酒加到 5 至 10 克醋酸，倒啜不覺酸病似的味道。另外一個試驗，是將酸酒用鹼中和後馬上啜其氣味，則其刺激味不減少。如此證明酸病氣味，乃另一物

所發生。此物為何，醋酸乙脂是也。後者之刺激氣味較醋酸大 200 倍，下表可以證明此事。

醋酸病酒之主因

酒號	氣味	揮發酸量 - 升中 Millie ^g .	醋酸乙脂量 Millie ^g .
1	無醋酸氣味	19.0	1.6
2	很少醋酸氣味	20.0	1.9
3	少醋酸氣味	18.7	2.0
4	醋酸氣味	18.2	2.5

如上表所示，一般所謂醋酸氣味之大小，不與醋酸成比例，實與醋酸乙脂多少相符合也。

然而醋酸乙脂如何生成呢？不少人說是完全化學的作用，Paynaud 氏則證明為生物內之酶所促成。化學作用，生成甚慢，葡萄酒加醋酸後，置 40 度處。六個月，其中醋酸乙脂只增加 0.8 Millie^g 耳。

醋酸菌生成醋酸乙脂量，強弱之分，因種而別。下表充分指明此一事實。表中數字為每升中千份之一分子克數。

醋菌之酯化力 (21 度下培養生成物)

菌號	物品名	第二天	第四天	第六天	第十天
第一號菌	醋酸		11.3	27.9	103.0
	醋酸乙脂		0.4	1.0	3.8
	酯化率		3.4	3.4	3.5
	氣味		不酸澀	同前	很酸澀
第二號菌	醋酸	14.0	72.5	138.0	
	醋酸乙脂	1.2	5.6	9.0	
	酯化率	7.9	7.2	6.1	
	氣味	稍酸澀	很酸澀	同前	

上表有趣的指出，第一菌之酯化率為 3.4—3.5%，而第二菌者為 6.1—7.9%。以後減少到 6.1% 者，概因培養基中乙醇過少之故（原為 9%）但環境改變，各菌酯化率則生差異。如第二號菌於溫度 11 度時，酯化率為 1.9%，21 度時 7.9—6.1%，31 度時為 2.6—3.3%。

由此論之，酒之醋化，不能飲用，固由醋菌所致，然醋菌之種類，環境寒暖，均有大影響也。

最後我們可以說，醋菌變壞之酒，并未完全毀滅酒之商業價值，因酒人可作成醋酒售也。

(4) 某些乳酸菌之致病性。

巴斯德說：「五、六、七、八等月，天氣熱後，酒窖內溫度增加數度，各地方的葡萄酒，多開始酸敗(Tourne)。這病狀概如下：酒渾濁深淺不等，置1至2公分之玻璃管中振動，則見酒中有絲光波紋各處浮動，這是氫機鹽類所致，最重要的是酒石酸鈣。若稍開桶口，酒由內射出。因此俗語說，酒怒發(Pousse)了。傾酒於杯，酒面周圍現一小泡圓圈。置空氣中，色變深，濁度增加。酒味轉變，趨於乏味。Rozier氏說怒發之酒，平凡，淡薄及惡味。」

酸敗却是葡萄酒之重要的普通病，由細菌所引起。不過現在可分二類，酸敗不生氣體者，都由乳桿菌(Lactobacillus)引起，酸敗且帶氣者，除乳桿菌外，別種菌也有參與者。比方酸食細球菌也能引起怒發症。

典型的酸敗病酒，盛於杯或瓶中，用力搖動後，對太陽看，見酒中發絲光或絲光渾濁，揮發酸及固定酸量大增，現不快之奶酸味，有呈顯著之 Mousey 氣味。顯微鏡下檢察，可以見到巴斯德所指出之長桿細菌，巴氏知道這些細菌是酒壞之源，產生乳酸及醋酸，不過他沒有分離出純種來。

工廠內的經驗告訴我們，這些細菌易繁殖於含殘糖及沈渣等多的酒中。比方因高溫或細菌之故，母酒中斷之酒，即易酸敗。法人三十年之經驗及美人最近的研究(克魯斯1936)，於葡萄汁中加入足量的 SO_2 或重亞硫酸鹽，則起初揮發酸少，發酸後殘糖微，則酒即易保持高尚品質而不敗。一個很有趣的實例，可舉出一談。美加省一家酒廠，用自然發酵法，不加 SO_2 ，釀造 200,000 加侖葡萄酒，結果都酸敗了。只好再加入人工燃料做成白蘭地，損失甚大。第二年用 SO_2 發酵，釀出健全旨酒。 SO_2 對葡萄酒釀造之功效，克氏指出如下表。

二氧化硫對葡萄酒成分及健全之功效表

發酵法	樣品號數	100 樣中 揮發酸克數	100 樣中 殘糖克數	100 樣中 總酸克數	酒精 % 容量
1 自然, 無 SO_2	5 1	0.137	0.566	0.51	12.93
2 用 SO_2	9 8	0.043	0.150	0.66	12.46

上表指出，不用 SO_2 者揮發酸量特多。凡含揮發酸量，每 100 樣酒在 0.1 克以上者，該酒即不健全。事實上健全之酒都不超過 0.06 克。

不用 SO_2 之新酒，每樣常含數百萬個之長桿細菌，而用二氧化硫發酵之酒內實際上無此種細菌。兩種酒中都少酵母，則多量揮發酸之形成，當然為酸敗菌之功。

酸敗菌之活動時期，不與乙醇發酵相符。實際上他們的初期出現，在乙醇發酵停止數月之後。翌年春季，氣溫漸高，去年所釀之新酒復變渾濁，發生二氧化碳。若此現象繼續下去，酒即酸敗了。救濟之道，常用低溫殺菌或添加 SO_2 。長桿之酸敗菌不止一種，但任何一種，都能引起酸敗現象，這是研究家都承認的。

若按月分析各桶酒之揮發酸，并用鏡檢離心機搖出酒之沈渣，化驗員能以知道酸敗

菌開始生長之時。因揮發酸量突然增加，即可使分析員想到長桿細菌之活動，再用顯微鏡檢察，則長桿菌之證明也，無疑矣。

Kramer (1892) 說酸敗酒中細菌，先分解酒中蛋白質成氨基酸，然後再分解此有機酸為蟻酸，丙酸，醋酸，琥珀酸，酪酸及乳酸。但是魏氏以爲他所觀察的酒過於腐敗了，因爲一般的酸敗酒中沒有酪酸。Duclaux 氏說酸敗酒中酒石酸迅速減少，而揮發酸則增加。揮發酸中以丙酸爲最多。Laboree (1904) 用純種酸敗菌接入葡萄酒中，發生酸敗。考察其中酒石酸減少，而生成乙酸及丙酸。由果糖形成甘露醇，則歸功於魏氏的甘露醇乳桿菌 (*L. menitropaeus*)。

Maz' (1904) 報告者的酸敗酒中之長絲桿菌，能生成甘露醇，酪酸及乳酸，法人所說的甘露醇微菌，與魏氏的甘露醇乳桿菌很像。魏氏說 (1912)，瑞士葡萄酒之酸敗，沒有法國南部及北非者多，原因在瑞士酒中固定酸度大。酸度小及殘糖多易於酸敗是實事。但德國葡萄酒之少有酸敗者，似應歸功於應用 SO_2 之普遍，不能只注重酸度高也。Pacottet (1928) 說阿根廷之葡萄酒亦多酸敗。

酸敗菌之研究，魏氏 (1912) 首開其端。分離純種，試驗形態及生理性質，用純種菌誘起酒病。結果定其菌名曰甘露醇乳桿菌。Nielsen (1929, 1930, 1932) 自南非洲之甜及加濃葡萄酒中分離出之長絲桿菌能在 18% 酒精中生長自如。但是此細菌需要一種生長素，酵母沈渣中含有之，且需有相當的糖存在才能生長，可變其糖爲甘露醇。Fevrier (1925) 報告，自含 19—20% 酒精之加濃南非葡萄酒中，分離出一種長桿菌，爲致病菌，抗熱力特強，80 度 15 分鐘。可是 Pacottet 等歐洲學者謂說，欲殺死酸敗菌，須 60 度 1 至 2 分鐘。加省之加濃酒，含酒精 20%，克魯斯曾自其中分離出酸敗菌，能抵抗 80 度 2 分鐘以上。

d'Estiveaux (1935) 自葡萄牙之加濃酒 (18.5%) 中分離出一種克氏陽性菌，常成對。端見鈍角。此鈍角鏈狀細胞，爲長桿之酸敗菌的特徵。Pederson (1929) 曾發表乳桿菌專報，其中關於葡萄酒中者不少，足資參考。

1936 年克魯斯等發表其關於美國加州葡萄酒酸敗菌之研究，頗可重視。在加利弗尼亞州，酸敗病之發生，常在酒高溫度中釀成之後，有時於乙醇發酵之後，但最常見者爲開春氣溫增高時，揮發酸迅速增高，有時 100 撮酒中能有 0.3 克之多，絲光渾濁頗多。最後氣味則變爲 Mousiness，這病的增長，可加百萬分之 75—100 份之 SO_2 阻止之，并且這也是通常防止的辦法。兩症發生後味尚未變惡，挽救之道，或迅速通過 20 度溫度殺菌，或濾過除菌，有時加 SO_2 至百萬分之 75 份以上也可。葡萄汁中加 SO_2 150 份以上，發酵後之新酒，常含足量的 SO_2 以防止細菌之生長。

克氏由 20 種以上之酸敗酒中，分離出純種菌來。其中兩種無致病性，其餘均爲使酒酸敗。這些致病菌，於外觀上頗爲相似，細胞不活動，爲不生孢子之桿狀，單個或成對，或成三或四個相連之短鏈。雙細胞接連處成 90—120 度之角。平均細胞之大爲 $0.9 \times 4.5-0.9 \times 6.5 \mu$ 。克氏陽性。曾用葡萄汁瓊脂於無氧下分離出之，但接種數次後，易於有氧下生長了。將甜葡萄酒 (Muscatel, Port, etc) 沖淡至含酒精 10—12%，殺菌後接入致病細菌，20—33 度，48—72 小時，即可大量繁殖。此菌也能在加省葡萄汁

之沖淡液中迅速生長。於此種培養下，特別之 Mousey 氣味，亦能產生。這菌能發酵果糖，葡萄糖及木糖，形成酸且無氣體發生，最終酸鹼值為 4.0。於阿拉伯糖，甘露糖，甘露醇，甘油，乳糖，蔗糖，分解乳糖，棉子糖及糊精液中未見發酵現象。發酵果糖之主要最終生成物為乳酸及醋酸。未見甘露醇。百萬分之 75 份之 SO_2 能抑止此菌生長。容耐酒精最高量，於無 SO_2 情況下，可以在含酒精 16.2% 之酒（外加葡萄汁 4.5%）中茂盛繁殖，於 18% 之酒中生長緩慢。因其不能於培养基及酒中形成二氧化碳，故非 Pousse 病之致病菌。同一理由，確定為 Hemofermentative Lactobacillus 同族嗜性乳桿菌，較異發酵性者（Heterof. L.）為妥。瓦氏等認為是一新種，命名黑氏乳桿菌（*L. hilgardii*），蓋為紀念加州大學農學院之創辦人，且在加州最初組織葡萄酒會社之 Hilgard 博士也。但是 Douglas 等研究此菌後，覺得與 *L. plantarum* 像似，故細菌書誌，多併入此菌矣。

(5) 怒發症 Pousse

葡萄酒酸敗後，有生 CO_2 者，有不生氣體者。致病的原因，有主張一元論者，如巴氏，魏氏，杜可樓等等，而 Kayser (1913) 等則以為由多種菌所誘起。我們同意後者。克魯斯說，怒發症與酸敗症之主要區別，在產生氣體，普通形成甘露醇，似可名曰甘露醇病云云。甘露醇病葡萄酒是引用巴斯德的話。巴氏曾數次發表論文，說明此病。克氏之黑氏乳桿菌為只引起酸敗病徵的例子，魏氏之甘露醇乳桿菌為怒發症菌的例子。其他能在葡萄酒中生長且產氣體的細菌，都可說是怒發病菌，如魏氏指出，瑞士酒中普遍存在之酸食細球菌是。

(6) 甘露醇病葡萄酒

放一酒酸敗葡萄酒於玻璃片上，室溫自然蒸發後，置顯微鏡下，用低倍鏡頭察之，概可看見甘露醇之典型結晶。克魯斯氏常用此法考察美國加州，因高溫發酵中斷之葡萄酒，是否有甘露醇生出。歐洲學者，研究此病者甚多如 Pacottet (1926)，Sannino (1925)，Nielsen (1930 及 1932)，Couche (Modern Detection of Wine Diseases 1935)，魏氏等等。他們都說致病菌在乙醇發酵時已開始繁殖，在較熱的地方，如北非及法國南部，尤其如此。乙醇發酵後的酒，病菌也能繁殖。

Gayon 氏 (1901) 曾自病酒分離出純種細菌，且詳究其形態與生理。其報告為有價值的文獻之一。他所見的菌與魏氏者不一樣。能使果糖變成甘露醇，且產生 CO_2 ，固定酸及大量的揮發酸。固定酸來自果糖及葡萄糖，多為乳酸，揮發酸多為醋酸。不能分解酒石酸。此點，著者依之與酸敗菌以區別。因後者能分解酒石酸也。這甘露醇菌產生乙醇，甘油及琥珀酸。所生成之甘露醇不能再分解，故積聚起來，有時能達百分之好幾。

魏氏的報告，更為重要。他們的甘露醇菌，常為瑞士蘋果酒及梨酒之致病菌。此菌能使葡萄酒產生奶酸的味道，類似酸菜的氣味，其他多量乳酸細菌均具此一技能。甘露醇酒的另一特徵，為水溶固體物多，因甘露醇之故也。甘露醇酒，由乳酸，醋酸，甘露醇及些醣類，組成一種別緻的酸甜味道。

魏氏在其有名的葡萄酒內之細菌一文中，詳細的指出數種甘露醇乳桿菌（*L.*

Mannitop ens f, k, p, g 及 t) 之形態及培養與生化特徵。貌氏菌之前四種由水果酒中分離出，後一種由一種葡萄酒中得到。外加葡萄汁之葡萄酒中培養，形成長桿或絲條之菌體。在顯微上，則成短桿狀。於一種加果糖之酵母煮汁中，其 f 型菌將 62—72% 之果糖變成甘露醇。貌氏菌能變果糖 13.6% 為醋酸，又 12.6% 為乳酸。形成 CO₂，且於酵母煮汁中生 Mousey 氣味。發酵葡萄糖及分解乳糖形成乳酸，醋酸及二氧化碳，但無甘露醇生出，有少量之乙醇，但無 Mousey 氣味。能分解蔗糖，生乳酸，醋酸，CO₂，乙醇及甘露醇，但在發酵液中從未檢到糖化糖。發酵麥芽糖成乳酸，醋酸及乙醇。不能分解乳糖。這是一點為與乳中乳酸菌不同之處。棉子糖能分解。1-阿拉伯糖及木糖能被利用，但 Rhamnose 則否。(前面說的 Gayon 氏甘露醇菌不能利用阿拉伯糖，應當注意。) 破壞蘋果酸，生多量乳酸及少量醋酸。不能利用酒石酒鹽。能消化檸檬酸，但乳酸及琥珀酸則否。

貌氏並研究其他五種近似的甘露醇細菌，這些菌之特徵是形成絲條或由長桿所接成之絲條鏈的。如同甘露醇乳桿菌，他們由果糖形成甘露醇，乳酸，醋酸及二氧化碳。由葡萄糖及分解乳糖只能生甘露醇，其他酸及氣味全如上。貌氏叫這一羣細菌為 *L. gracilis*。與甘露醇乳桿菌不同者，在不能利用蔗糖，麥芽糖及棉子糖，其對五碳糖之作用，與前菌亦不相同。貌氏並鑑定瑞士紅葡萄酒中甘露醇細菌，名 *L. intermedius*，及阿爾及利亞酒中之同類，名 *L. gayoni*。此二菌與甘露醇乳桿菌近似。

由以上所述各家報告，可知在酒中使果糖變為甘露醇的細菌不止一種。依其形態生理，可區別為若干種，但都為乳桿菌屬之菌類。不過都為早期作品，以最近方法，再作比較研究後，才能確定其究竟也。

管制此類細菌之道，在乙醇發酵及陳放酒時，只要有足量的 SO₂，即可防止。這類菌對二氧化硫感覺都很靈敏，百萬份之 100 份 SO₂，即能生長。低溫殺菌及濾過除菌，均可應用。

(7) 葡萄酒中之苦味菌

克魯斯氏說從來美國加省葡萄酒，未遭遇過巴斯德所說這樣的病。巴氏對這病的認識是怎樣呢。據說苦味病有兩種。第一種發生於陳放二或三年之酒中。第二種只現於老年酒，故特別稱之曰老味 (*Gout de vieux*)。法國之 Pinot 葡萄是專作上等陳紅葡萄酒的，而苦味病也專攻擊此類酒。普通酒陳放不久，在此病發生。病發之初，酒氣改為特別，色相轉惡，味趨平淡，但苦味尚未顯露，若不設法醫治，病發展迅速，酒成苦水。且稍帶發酵味，因其中 CO₂ 所致。病可更趨嚴重，紅色消失，酒石消化，酒即不能飲用。15 法郎的貨，1 法郎不值矣。

巴氏研究許多發酒樣品後說，苦病仍由害生物所引起。這種細菌極易生長於 Cote d'Or 地方之上等酒，其他地方之普通酒中，不易繁殖。將苦酒底部洗淨，置顯微鏡下看，除一般之結晶外，有一種絲條長桿菌，經常存在於苦酒中。巴氏認為此即苦味菌。在生長時為桿狀，多為二或多個相接成鏈。不像老菌體上沈澱酒之紅色。

巴氏研究，酒苦後酒石酸鹽不減少，甘油則損失甚多。Duclaux (1900) 說苦味為甘油之分解物。紅葡萄酒之色素因病則洗淨。Voisenet 氏 (1910) 相信苦味乃由甘油所生之內烯醇 (*Acrolein* CH₂:CH·CHO) 所致。Dahlen (1878) 等不信苦味物由甘油生成，但係

丹寧生成物。貌氏傾向此說，且指出由丹寧生成之構酸雖無苦味，但構酸乙酯確有苦味。

巴斯德曾將同樣之酒 200 瓶，100 瓶加熱殺菌，餘 100 瓶未殺菌。結果後 100 瓶均變苦了，而前者則否。可知苦病由生物所引起，是無疑義的。Maz'e (1904) 由苦酒中分離出數種純種，性質與甘露醇菌相符合，但不能再引起苦味病。Peroncito (1888) 則能由苦味酒分離出之菌，接入紅葡萄酒引起苦味病。Voisenet (1910) 也分離出細菌，名之曰 *Bacillus amaracrylus*。

(8) 粘酒病

新白葡萄酒有時變粘。顯微鏡下指出有短桿狀菌之長鏈存在。故巴斯德報告稱之曰球菌念珠鏈，但是別的菌也能使酒發粘。Beersch (1893) 在粘酒中找到八疊菌，Aderhod (1894) 找到一種雙球菌，Kramer (1892) 分離出一長絲形細菌，命名 *Bacillus viscosus vini*。Maz'e 得到二種桿菌，有時形成絲條，為甘露醇菌之類似菌云。Kaysar (1909) 等分離出數種短桿菌，單個或成鏈。

不論菌類如何，都怕 SO_2 ，酒中有百萬份之 100 份之 SO_2 存在，即無由繁殖。壞酒之補救，可加丹寧後低溫殺菌。

(9) 髮狀菌之壞加濃酒。

美國加省之含酒精 18~20.5% 的加濃葡萄酒，有時底部形成一種毛圈沈澱，不加搖動，酒仍澄清。酒之成分，初少變化，後則揮發酸及固定酸增加，而含糖量減少。於顯微鏡下觀察，沈澱為濕髮一團，所以稱為髮狀菌也 *Hair bacillus*。菌體為長絲狀，但為桿菌所接成。鏡下形狀，此菌類似貌氏之 *L. gracilis*。Douglas (1936 及 1937) 兩次發表其髮狀菌之研究結果，此菌在一般之培養基上不生長，如葡萄酒，西紅柿汁，肉汁及其他。但是在沖淡之甜葡萄酒中，生長優良，故可用其瓊脂培養基，分離出純種云。此菌對 SO_2 反應亦大，百萬份之 75-100 份之 SO_2 即可抑制其生長。100 毫克含酸 (酒石酸) 0.50 克，或其 pH 值 8 以下或 7 以上之酒，髮狀菌亦不繁殖。

此菌之傳染，概在貯酒桶，抽水機，裝酒器，管件等等，宜注意之。預防之道，在裝瓶時一升酒中須有 75-100mg 之二氧化硫。加省之酒，數百萬加侖，用此法保壘了。

(10) 其他之細菌病

貌氏曾分離一菌，能分解酒石酸及其鹽類，形成二氧化碳及醋酸。定名曰 *Bacterium Tartarophthorum*。

Pacottet 氏等研究白葡萄酒之變酸不清，係 *Micrococcus anomalus* 所引起。病酒帶奶酸味，無氣產生。蓋亦為腐發酵性乳桿菌也。

(三) 蘋果酸分解細菌

在瑞士，德國及法國，很早就知道酸葡萄酒之酸度，常於乙醇發酵後，很快的會減少，變成可飲用的酒。有人主張酸度減少乃酒石酸氫鉀沈澱之故，但經 Moslinger (1901) 氏等之研究後，知道為蘋果酸變成乳酸及 CO_2 的原因。由二鹽基性酸轉為一鹽基性酸後，酸度大見減少。這作用由細菌引起，故多稱為蘋果酸的乳酸發酵 (Malolactic fermentation)。

此種情形，在當時固屬罕見，然其所以發生者，實由於通商口岸之開放，及外國商人之侵入，而中國之經濟，亦隨之而發生變化。此種變化，在當時固屬罕見，然其所以發生者，實由於通商口岸之開放，及外國商人之侵入，而中國之經濟，亦隨之而發生變化。此種變化，在當時固屬罕見，然其所以發生者，實由於通商口岸之開放，及外國商人之侵入，而中國之經濟，亦隨之而發生變化。

UNITED STATES DEPARTMENT OF THE INTERIOR
BUREAU OF LAND MANAGEMENT

WYOMING

Section 10, Township 10N, Range 10E, T10N, R10E, S10

Section 10, Township 10N, Range 10E, T10N, R10E, S10
Section 10, Township 10N, Range 10E, T10N, R10E, S10
Section 10, Township 10N, Range 10E, T10N, R10E, S10
Section 10, Township 10N, Range 10E, T10N, R10E, S10
Section 10, Township 10N, Range 10E, T10N, R10E, S10

Section 10, Township 10N, Range 10E, T10N, R10E, S10
Section 10, Township 10N, Range 10E, T10N, R10E, S10

Section 10, Township 10N, Range 10E, T10N, R10E, S10
Section 10, Township 10N, Range 10E, T10N, R10E, S10

Section 10, Township 10N, Range 10E, T10N, R10E, S10

Section 10

HUANG-HAI

Number 4

MEMORANDUM AND PRESENTATION

MEMORANDUM

Subject

- (1) The ... of ... to the Government of ...
- (2) The ... and ... to the ...
- (3) ... and ...

A copy ... is placed at the end of this ...

MEMORANDUM

Subject

Such is the ... of ...

Very ...

...

...